

【総説】

レギュラトリーサイエンスと迅速コルチゾール測定法の開発

Regulatory Science and Development of Rapid Cortisol Assay

金沢大学医薬保健研究域医学系未来医療人材養成拠点事業
プログラムマネジメント室
米 田 隆

はじめに

レギュラトリーサイエンスとは、いろいろな定義があるが、まとめると科学と人間との調和を図る科学である。特に医学の分野では規制のあり方を考える科学であり、医薬品、医療機器の開発・評価に用いるための科学を意味する。最近の医学研究分野では、①ディオバン事件に代表されるような数々の研究データのねつ造問題、②我が国の基礎研究論文数が世界的に上位に位置するのに比べ(2008-2012年 4位)、臨床研究論文数が(2008-2012年 23位)と振るわないこと、③近年の医療の更なる高度化・効率化や治療法が未確立な疾患への対応が求められる状況、④2015年4月からの日本医療研究開発機構(AMED)設立などにみられるように健康・医療の分野を我が国の成長分野として位置づけと世界に日本の健康・医療関連産業を展開して国富の拡大を目指す政策に関連して、このレギュラトリーサイエンス分野が国内で注目を浴びてきている。現在、私が所属する未来医療人材養成拠点事業プログラムマネジメント室は、医学系研究を行っている学生に、このレギュラトリーサイエンスを早期から教育する目的で設立された。その内容は特に医学領域に特化し、マーケティング、デザイン、イノベーションから始まり、特許申請と取得、探索的な臨床研究の方法論(統計解析からプロトコル作成)、研究倫理指針、非臨床試験、臨床試験など薬事承認とそれに関するGood Laboratory Practice (GLP), Good Clinical Practice (GCP)などの法規的規制までにわたる。本稿では医学系研究者が最低限度知っておくといわれる基本的内容について、私のライフワークである原発性アルドステロン症研究に関連して迅速コルチゾール測定法の開発した経緯をもとに概説する。

原発性アルドステロン症

原発性アルドステロン症は、2次性高血圧症の中で最も頻度の高い(全高血圧患者の5-10%)高血圧症であり、国内でも200-400万人の患者が存在すると推定されている¹⁻⁴⁾。さらには、通常の本態性高血圧と比較しても、心血管、腎合併症の合併頻度が高く(脳卒中 3.8倍、心筋梗塞 6.7倍、心房細動 12.2倍)、早期発見や適切な加療が必要である^{5,6)}。これは、血圧による臓器障害に加え、過剰なアルドステロンそのものによる臓器障害作用が原因である(図1)。原発性アルドステロン症は治療の面から大きく、片側性と両側性の2つのタイプに分類できる。

片側性は、アルドステロン過剰の原因が左右のどちらかの副腎に由来するもので、患側の副腎の摘出で完治する、いわゆる“手術で治る高血圧症”である。両側性とは、アルドステロンの過剰の原因が両側の副腎に由来するもので、この場合は、血圧のコントロールとアルドステロン作用の抑制のため、ミネラルコルチコイド受容体拮抗剤を中心とした薬物療法を行う。それゆえにアルドステロン症の病型診断が、治療計画の上で重要である。原発性アルドステロン症の典型例では、副腎腫瘍や副腎腫大などを認めるが、最近では腫瘍径が1mm以下の例も報告されており、CT検査などの画像検査は60%程度でしか正確ではなく、病型診断には不十分とされている⁴⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾(図2)。現時点では、病型診断に副腎静脈サンプリングと呼ばれるカテーテルを用いた検査が、最も信頼できる病型診断法とされている。しかしながら、この副腎静脈サンプリングは、侵襲的検査であり、技術的には難しく、全国のおよび世界的に見ても適正な検体採取率は平均30%

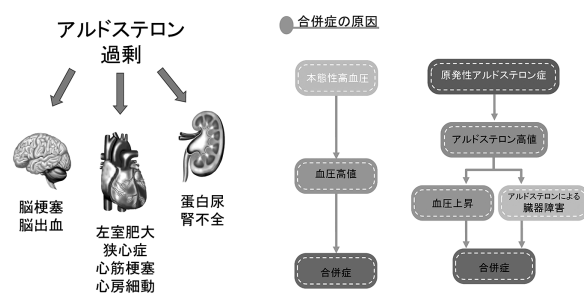


図1. 原発性アルドステロン症は脳・心血管障害、腎障害の頻度が多い

病理診断された片側性原発性アルドステロン症23例での術前CT所見の差を示す。

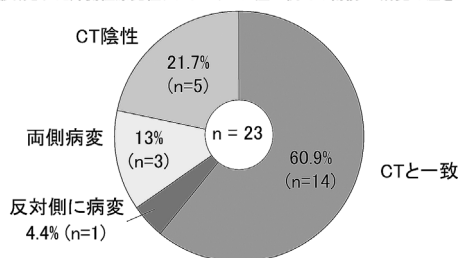


図2. 金沢大学附属病院でのCT所見と病変部位（病理診断で確定）の比較

程度であり、90%以上の成功率を収める施設は数えられる程度ある¹⁰⁾¹⁵⁾。この副腎静脈サンプリングの成功率を改善することが国内外で原発性アルドステロン症を診療する上でのアンメットニーズである。

副腎静脈サンプリング

副腎静脈サンプリングとは 図3に示すように、大腿静脈をセルジnger法で穿刺し、カテーテルを進め、その先端を左右の副腎静脈に置き、血液検体を採取する検査である。副腎静脈サンプリングが成功したかどうかは、副腎静脈内に置いたカテーテルから採取した血液検体が副腎由来かどうかで判定するが、それには血液検体中の血清（あるいは血漿）コルチゾール濃度が用いられる。通常は、検体中のコルチゾール濃度が下大静脈（あるいは末梢静脈）のコルチゾール濃度の2倍以上であれば、副腎からの血液検体として判断される。そして、左右の副腎静脈から適切に検体が取れた場合、初めて副腎静脈サンプリングが成功となる。コルチゾール濃度測定を自己の施設で行っていない場合は、その濃度判明に通常1週間を要し、大学病院など自己施設で測定している場合でも、数時間～数日が必要である。そのため、副腎静脈サンプリングが終了したあとで、副腎静脈サンプリングが成功したかどうかが判明することになるが、失敗していれば再度、入院し副腎静脈サンプリングのやり直しが必要になる。

副腎静脈サンプリングの不成功原因

副腎静脈サンプリングが不成功となる原因はいくつか考えられるが、主なものを図4に示す。特に右副腎静脈からのサンプリングは、右副腎静脈が数ミリと細いことに加え、下大静脈から直接分岐していることがカテーテルの血管選択を困難にしている。また、副肝静脈などが右副腎静脈に合流するなどの解剖学的な破格があるとさらに困難になる。左副腎静脈はカテーテルが比較的选择しやすいが、下横隔静脈などからの血流で検体が希釈されやすい。

副腎静脈サンプリング中コルチゾール測定

副腎静脈サンプリングの成功率を改善する方法として副腎静脈サンプリング中にコルチゾール測定した報告はすでにいくつか存在する¹⁰⁾¹⁷⁾²³⁾。副腎静脈サンプリング中に副腎静脈から適切な血液検体が採取されていないと分かれば、直ちに副腎静脈内のカテーテルの位置を少し変え、検体採取をやり直すだけで、適切な血液検体が得られ、副腎静脈サンプリングの成功率が改善している。しかし、そのためには、臨床検査技師を副腎静脈サンプリング中のコルチゾール測定専用配置し、かつ、その他の検体検査を中止しなければならない。また、副腎静脈サンプリングの時間も何時間にも及ぶことが指摘されており、現実的でないといわれている¹⁰⁾¹⁷⁾²³⁾。我々はその問題を解決するために、数分内で誰にでもどこでも測定できる新しいタイプの迅速コルチゾール測定法を開発した。

迅速コルチゾール測定法の開発(図5)

ホルモンなど血液中に微量しかいないものを測定するには、抗原抗体反応を用いる必要があるが、通常、この抗原抗体反応は生理的な条件では数時間を要する。この反応

をいかに迅速にするかということが、ホルモンなどの迅速測定開発の鍵となる。最近のナノテクノロジー進歩は眼に見張るものがあり、金コロイドのナノ粒子を用いることで抗原抗体反応が数分で完了することができる。それに加えて競合法測定原理に応用することを考え、北陸先端科学技術大学マテリアルサイエンス科 民谷栄一教授(現大阪大学大学院工学部 教授) 高村 禪 准教授(現教授)、井手上公太郎研究員と開発に取り組んだ。図5に示すように、原理はイムノクロマト法を用いた競合法であり、金コロイド粒子をラベルしたコルチゾールと検体中のコルチゾールがイムノクロマト膜上の特異的結合部位に競合して結合することによって、検体中のコルチゾール濃度を測定する。

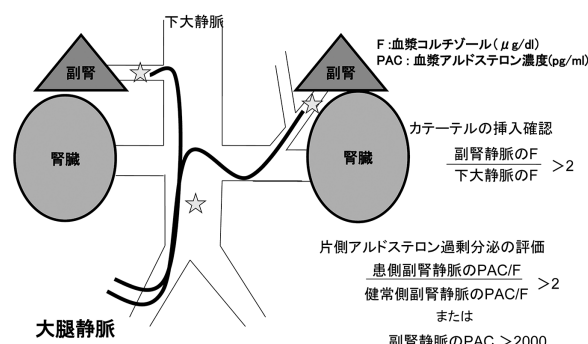


図3. 副腎静脈サンプリング

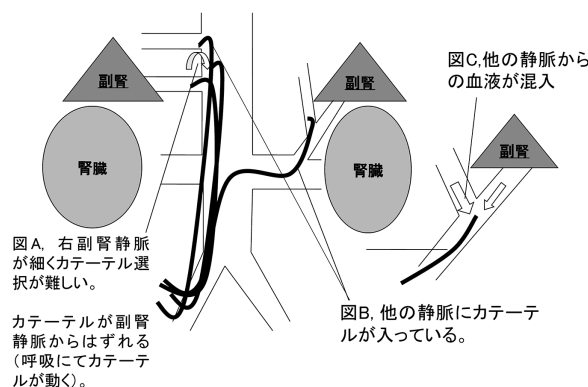


図4. 副腎静脈サンプリングの主たる不成功の原因

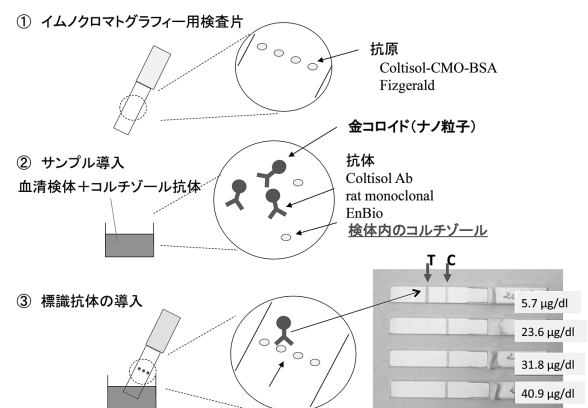


図5. 迅速コルチゾール測定原理－競合法

合するということである。テストラインは赤色でその強度が強くなればなるほど血液検体中のコルチゾール濃度が低いことを示す。肉眼でも半定量的にコルチゾール濃度を判定可能だが、このテストラインの赤色強度をイムノリーダーを用い測定することで定量可能である(図4)。半定量には5分、定量は6分以内で測定可能である。抗コルチゾール抗体としてはモノクローナル抗体(CRT1G6; Fujikura Kasei Co., Ltd., Ibaraki, Japan)が使用されている。実際の測定手順(図6)

1. 血液検体を1mLをチューブにいれ、5200gで1万回転で1分間、遠心分離する。
2. 100 μ Lの血清(血漿)を測定キットのウェルに入れる。
3. 5分後にイムノクロマト紙上のテストライン部分に赤色のラインが出現するか判断する。
その赤色強度で判定量する。
4. テストラインの赤色強度をイムノクロマトリーダーで定量する。

上記の手順は臨床検査技師等の専門知識、技術がなくても可能である。

特許申請と取得

本迅速コルチゾールアッセイ系に関しては、2009年の時点では開発が終了していた。当時の医学系アカデミアではある程度の研究成果がでると、まず論文投稿する傾向があったが、論文投稿、学会発表などで先に研究成果を公開してしまうと、その後に特許申請が出来なくなる。研究成果が特許申請に値するかを審査するシステムが必要である。残念ながら医学部系の大学にそのような部署がある大学は少ないと思われる。当時より、北陸先端科学技術大学ではシーズの特許申請に値するかどうかの判定を行い、速やかに特許申請をする体制がすでに整っており、本迅速コルチゾールアッセイ系に関しても特許申請を優先する提案があった。特許取得には数年かかるといわれているが、2009年11月25日に申請し、2014年8月 国内特許取得(特許第5590651号)、2015年1月 米国特許取得(United States Patent No. 8927219)した。現在の日本では、医学系研究においても特許申請や薬事承認

など目指した研究が求められる時代となっており、医学部系の研究者も、特許申請や取得の方法の詳細までは知ることには必要ないとしても、概略を知っておくことは共同研究チームを構築する上でも重要と思われる。

迅速コルチゾール測定法を用いた副腎静脈サンプリング成功率改善に関する臨床研究

ある製品を開発しても実際に社会で使用されなければ人々に貢献したことにならない。医学の世界でも、研究成果や開発したものが、医薬品や医療機器などとして、実際の医療現場で使用可能であり、また、有用かつ安全であることを示していく必要がある。現在の日本国内の体制では、そのための第一段階が臨床研究による評価である。現在、国内で臨床研究を行う場合には厚労省や文科省などの各種の研究指針に従い、各研究施設での倫理委員会承認、場合によれば、UMINなどの公開データベース等に登録する必要がある。また、時には、保険診療との兼ね合いで、保健医療機関及び保健医療養担当規則(第18条等)に対する手続き(厚労省への研究が混合診療に該当するか否かなどの確認や先進医療申請など)も必要である。それらの手続きの上、原発性アルドステロン症患者に副腎静脈サンプリング検査を行い、本迅速コルチゾールアッセイ系を用いる前は64%程度であった成功率が93%と劇的に改善した(図7)。有害な事象等も認められなかった。上記のように臨床研究で本迅速コルチゾールアッセイ系の有用性を証明しても実際には臨床現場(国内の保険診療)では使用することができない。国内の臨床研究は、海外の臨床研究と違い法律(Good Clinical Practice [GCP])で規制されていないため、その結果を薬事承認用データとして活用できない。国内において臨床研究は予備的な試験に相当すると考えてよいと思われる。今後、現実的に国内の医療現場に使用されるためにはGCPで規制される臨床治験(体外診断薬では臨床性能試験)を行う必要がある。

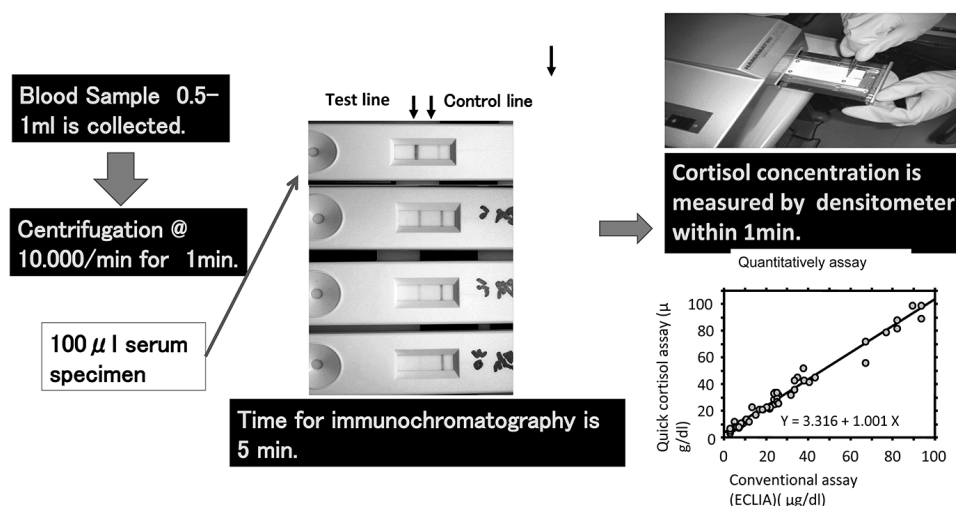


図6. 迅速コルチゾール測定原理—競合法

体外診断薬の薬事承認に向けて(図8)

医薬品や医療機器と違い体外診断薬の薬事承認は比較的簡略化されている。医薬品や医療機器の場合は

前臨床試験、臨床試験(フェーズⅠ,Ⅱ,Ⅲ)があり、承認までに数年以上かつ数百億円の費用がかかるといわれている。特にフェーズⅢではランダム化比較試験を必要とすることがほとんどで解析には複雑な統計解析法を駆使する必要がある。しかし、体外診断薬は、非臨床試験、関連試験、臨床性能試験でよく、体外診断薬が既存のものに類似している場合、独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)で承認基準適合品目と認定されれば、臨床性能試験は免除される。

①非臨床試験

この試験は、その内容が品質試験(感度試験、正確性試験、同時再現性試験)測定範囲、校正用基準物質の設定、安定性試験、性能試験(添加回収試験、希釈試験)などから成り、一見大学などの研究機関で行う基礎的な研究に見えるが、Good Laboratory Practice (GLP) という法律に則り行わなければならない。また、研究施設も、大学などのアカデミアでは通常は実施できず、医薬品、医療機器などの製造認可を受けた企業でのみ実施可能である。試験物にも、製造企業での型番が必要である。本迅速コルチゾールアッセイ系は特許の技術移転で金沢大学、北陸先端科学技術大学院大学、発明者3人(米田 隆、高村 禪、井手上公太郎)と契約を結んでいるトラスト

メディカル社で製造され (Stripの製品名:クイックコルチゾールキット 製品番号:Q-CTZ-1000, Reader製品名:Low・Middle・end・Reader 製品コードTOR210) 長期安定性試験以外の非臨床試験は終了している。

②関連試験

既存の体外診断薬との相関をみる試験である。すでに行われた臨床研究では相関を比較してあり良好な相関を認めているが(図6), non-GCPの臨床研究での結果であるため、再度、相関をみる必要がある。そのプロトコルに関しても、PMDAとの面談で確定したものが必要であり、大学などの倫理委員会の承認だけでは不十分である。本プロトコル内容に関しては2015年3月にPMDAと面談の上、確定した。同時に、本迅速コルチゾール測定法が従来のアッセイ系と類似している点も多くあり、承認基準適合品目の認定に関する面談も行ったが、アッセイ系の新規性などの理由により、承認基準不適合品目と認定されたため、臨床性能試験を求められることとなった。

③臨床性能試験

臨床性能試験では 通常2施設以上で150以上の検体を用い、疾患における有病正診率と無病正診率を求める試験や異常検体(溶血、乳び、黄疸)や薬物による影響を評価する試験が必要である。2015年、現在、本試験のプロトコル内容の確定のため、PMDAと面談交渉中である。プロトコル確定後臨床性能試験を行い、薬事承認を取得する予定である。臨床性能試験のプロトコル内容である試験実施法や統計解析法は、臨床研究で行った内容とほとんど変わらず、唯一の違いは 検体やデータ管理、モニタリングを第三者に委託しなければならないことである。本迅速コルチゾール測定法は予備試験的な意味合いを持つ臨床研究で、すでに画期的な成果が得られることは判明しており、今後の臨床性能試験でも良好な結果が得られることは確実である。

おわりに

医学系における研究は、これまで探索的な研究で主であったが、時代の要求とともに、開発的研究についても求められるようになってきている。そのためレギュラトリーサイエンスという科学の重要性はさらに高まると思われる。

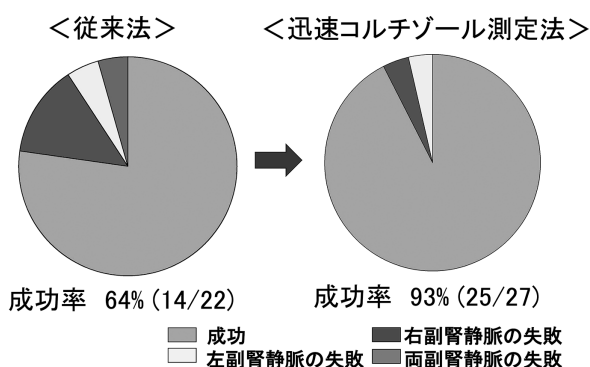


図7. 迅速コルチゾール測定を用いた副腎静脈サンプリングの成功率。

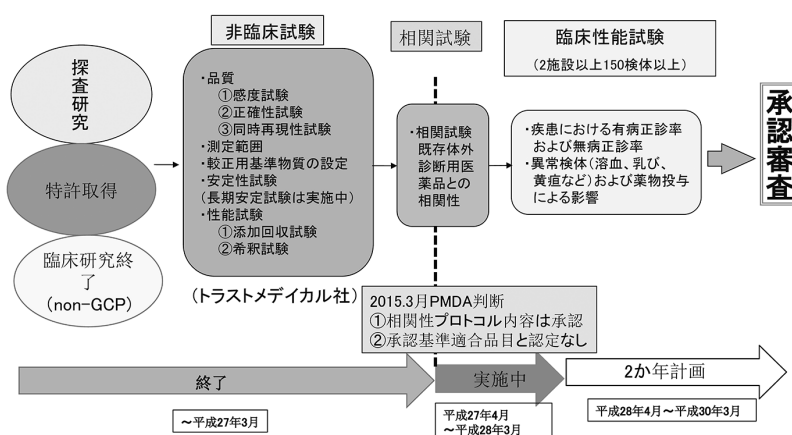


図8. 体外診断薬の薬事承認に向けて

る。私が、原発性アルドステロン症診療でのアンメットニーズの一つであった副腎静脈サンプリング成功率の向上のために迅速コルチゾール測定法の開発にとりかかったのが2009年で、出口が見えてきているがすでに7年経過している。

薬事承認に関連する研究は時間がかかり根気強く継続していくことが重要であり、レギュラトリーサイエンスに関する知識が必要である。未来医療研究人材養成拠点形成事業では、レギュラトリーサイエンスに関する教育を行っており、これからの医療系の開発に携わる研究者に必ず役立つものと思われる。

謝 辞

本総説の執筆にあたり研究のご指導を受け賜りました金沢大学医薬保健研究域医学系臓器機能制御学（第二内科）の山岸正和教授ならびに教室員、大阪大学大学院工学部の民谷栄一教授、北陸先端科学技術大学院大学の高村 禪教授、関係の先生方に深甚なる謝意を表します。また、金沢大学の未来医療研究人材養成拠点形成事業の責任者でもあり、執筆の機会を与えてくださいました金沢大学十全医学会編集委員長 井関尚一教授ならびに関係各位に厚く御礼申し上げます。

引 用 文 献

- 1) Omura M, Saito J, Yamaguchi K, Kakuta Y, Nishikawa T. Prospective study on the prevalence of secondary hypertension among hypertensive patients visiting a general outpatient clinic in Japan. *Hypertens Res* 2004;27:193-202.
- 2) Mulatero P, Stowasser M, Loh KC, et al. Increased diagnosis of primary aldosteronism, including surgically correctable forms, in centers from five continents. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1045-1050.
- 3) Ito Y, Takeda R, Karashima S, Yamamoto Y, Yoneda T, Takeda Y. Prevalence of primary aldosteronism among prehypertensive and stage 1 hypertensive subjects. *Hypertens Res* 2011;34:98-102.
- 4) Takeda Y, Karashima S, Yoneda T. Primary aldosteronism, diagnosis and treatment in Japan. *Rev Endocr Metab Disord*. 2011;12:21-5.
- 5) Takeda R, Matsubara T, Miyamori I, Hatakeyama H, Morise T. Vascular complications in patients with aldosterone producing adenoma in Japan: comparative study with essential hypertension. The Research Committee of Disorders of Adrenal Hormones in Japan. *J Endocrinol Invest* 1995;18:370-3.
- 6) Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1243-8.
- 7) Magill SB, Raff H, Shaker JL, et al. Comparison of adrenal vein sampling and computed tomography in the differentiation of primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1066-71.
- 8) Sarlon-Bartoli G, Michel N, Taieb D, et al. Adrenal venous sampling is crucial before an adrenalectomy whatever the adrenal-nodule size on computed tomography. *J Hypertens* 2011;29:1196-202.

- 9) Karashima S, Takeda Y, Cheng Y, Yoneda T, Demura M, Kometani M, Ohe M, Mori S, Yagi K, Yamagishi M 2011 Clinical characteristics of primary hyperaldosteronism due to adrenal microadenoma. *Steroids*. 76:1363-6
- 10) Vonend O, Ockenfels N, Gao X, et al. Adrenal venous sampling evaluation of the German Conn's registry. *Hypertension* 2011;57:990-5.
- 11) Young WF, Stanson AW, Thompson GB, et al. Role for adrenal venous sampling in primary aldosteronism. *Surgery* 2004;136:1227-1235
- 12) Funder JW, Carey RM, Fardella C, et al. Endocrine Society. Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:3266-81.
- 13) Kempers MJ, Lenders JW, van Outheusden L, et al. Systematic review: diagnostic procedures to differentiate unilateral from bilateral adrenal abnormality in primary aldosteronism. *Ann Intern Med*. 2009;151:329-37.
- 14) Rossi GP, Barisa M, Allolio B, et al. The Adrenal Vein Sampling International Study (AVIS) for identifying the major subtypes of primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 97:1606-14.
- 15) Daunt N. Adrenal vein sampling: how to make it quick, easy, and successful. *Radiographics*. 2005;25 S143-58.
- 16) Diego Miotto, Renzo De Toni, Gisella Pitter, Teresa Maria Seccia, Raffaella Motta, Matteo Vincenzi, Gianpietro Feltrin, Gian Paolo Rossi. Impact of Accessory Hepatic Veins on Adrenal Vein Sampling for Identification of Surgically Curable Primary Aldosteronism. *Hypertension*. 2009; 54: 885-889
- 17) Woods JJ, Sampson ML, Ruddel ME, Remaley AT. Rapid intraoperative cortisol assay: design and utility for localizing adrenal tumors by venous sampling. *Clin Biochem*. 2000;33:501-3.
- 18) Mengozzi G, Rossato D, Bertello C, et al. Rapid cortisol assay during adrenal vein sampling in patients with primary aldosteronism. *Clin Chem* 2007;53:1968-71.
- 19) Auchus RJ, Michaelis C, Wians FH Jr, et al. Rapid cortisol assays improve the success rate of adrenal vein sampling for primary aldosteronism. *Ann Surg*. 2009;249:318-21.
- 20) Betz MJ, Degenhart C, Fischer E, et al. Adrenal vein sampling using rapid cortisol assays in primary aldosteronism is useful in centers with low success rates. *Eur J Endocrinol* 2011;165:301-6.
- 21) Reardon MA, Angle JF, Abi-Jaoudeh N, et al. Intraprocedural cortisol levels in the evaluation of proper catheter placement in adrenal venous sampling. *J Vasc Interv Radiol* 2011;22:1575-80.
- 22) Rossi E, Regolisti G, Perazzoli F, et al. Intraprocedural cortisol measurement increases adrenal vein sampling success rate in primary aldosteronism. *Am J Hypertens* 2011;24:1280-5.
- 23) Stowasser M. Improving the success and reliability of adrenal venous sampling: focus on intraprocedural cortisol measurement. *Clin Chem*. 2012;58:1275-7